

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 6 月 21 日 (21.06.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/44469 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 14/47,
C12N 1/21 // C07K 19/00, I/107, (C12N 1/21, C12R 1:19)

305-0812 茨城県つくば市大字東平塚586番地2 Ibaraki
(JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/08837

(74) 代理人: 弁理士 高橋秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi
et al.); 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁
目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka
(JP).

(22) 国際出願日: 2000 年 12 月 14 日 (14.12.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平 11/358693
1999 年 12 月 17 日 (17.12.1999) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BY, BZ, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU,
SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, VN, YU, ZA.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,
LTD.) [JP/JP]; 〒540-0045 大阪府大阪市中央区道修町
四丁目1番1号 Osaka (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 末永正人 (SUE-
NAGA, Masato) [JP/JP]; 〒663-8105 兵庫県西宮市中島
町11-15-302 Hyogo (JP). 山田隆央 (YAMADA, Takao)
[JP/JP]; 〒580-0003 大阪府松原市一津屋町4-3-26 Os-
aka (JP). 西村 紀 (NISHIMURA, Osamu) [JP/JP]; 〒

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING KiSS-1 PEPTIDE

(54) 発明の名称: KiSS-1ペプチドの製造法

(57) Abstract: KiSS-1 peptide or its salt can be industrially produced on a mass scale by subjecting a fused protein or peptide, wherein KiSS-1 peptide is ligated to the N-end of a protein or a peptide having cysteine at the N-end, to the reaction of cleaving the peptide bond in the amino acid side of the cysteine residue.

(57) 要約:

N末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドのN末端にK i S S -
1 ペプチドを連結した融合蛋白質またはペプチドをシステイン残基のアミノ
酸側のペプチド結合の切断反応に付すことにより、K i S S - 1 ペプチドまた
はその塩を工業的かつ大量に製造することができる。

WO 01/44469 A1

明 細 書

K i S S - 1 ペプチドの製造法

5 技術分野

本発明は、融合蛋白質またはポリペプチドを製造し、次いで該融合蛋白質またはポリペプチドをペプチド結合の切断反応に付すことにより、K i S S - 1 ペプチドまたはその塩を製造する方法に関する。

10 背景技術

遺伝子組換え技術を用いて、ペプチドを製造するに際しては、ペプチドが細胞内で、分解を受けやすいために、融合蛋白質の形で発現させることがしばしば行なわれている。融合蛋白質からの目的ペプチドの切り出しには、ブロムシアンを用い化学的に切断する方法（イタクラら、Science, 198, 1056(1977))、
15 ファクター Xaを用い酵素的に切断する方法(ナガイら、Methods in Enzymology, 153, 46(1987)) が知られている。

さらに、蛋白質中のペプチド結合を切断する方法として、2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸によるアシルシステイン結合の切断が知られている（「生化学実験講座」1，タンパク質の化学II，日本生化学会編，東京化学同人発行，
20 第247～250頁1976年）。しかしながら、蛋白質からの目的ペプチドの切り出しについては、開示されていない。

従来知られている技術において、融合蛋白質からの目的ペプチドの切り出しに際し、ブロムシアンを用いる場合には、メチオニンを含有するペプチドの製造には適用することはできないし、切り出し時の収率等に問題が多い。

25 このように、融合蛋白質またはポリペプチドから目的とするペプチドを効率良く切り出す方法が望まれている。

発明の開示

本発明者らは、新規生理活性ペプチドであるK i S S - 1 ペプチドまたはそ

の塩を効率良く製造する方法について鋭意検討を加えたところ、N末端にシステインを有する蛋白質またはポリペプチドのN末端にK i S S - 1 ペプチドを連結した融合蛋白質またはポリペプチドを製造し、次いでこれをペプチド結合を切断する反応に付すことにより、K i S S - 1 ペプチドまたはその塩を効率良く製造できることを見出した。

すなわち、本発明は、

(1) N末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドのN末端に、K i S S - 1 ペプチドを連結した融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付すことを特徴とするK i S S - 1 ペプチドまたはその塩の製造法、

(2) N末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドのN末端に、K i S S - 1 ペプチドを連結した融合蛋白質またはペプチドをコードするDNAを有するベクターを保持する形質転換体を培養して融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を発現させ、発現された融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付すことを特徴とするK i S S - 1 ペプチドまたはその塩の製造法、

(3) K i S S - 1 ペプチドのC末端がアミドである第(1)項または第(2)項記載の製造法、

(4) 切断反応がS-シアノ化反応、次いでアンモノリシスまたは加水分解反応に付す反応である第(1)項または第(2)項記載の製造法、

(5) K i S S - 1 ペプチドが配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドである第(1)項または第(2)項記載の製造法、

(6) K i S S - 1 ペプチドが、①配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列のN末端から第40～54番目からなるアミノ酸配列を有するペプチド、②配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列のN末端から第45～54番目からなるアミノ酸配列を有するペプチド、③配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列のN末端から第46～54番目からなるアミノ酸配列を有するペプチドまたは④配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列のN末端から第47～54番目からなるアミノ酸配列を有するペプチドである第(1)項または第(2)項記載の製造法、

- (7) N末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドが、N末端にシステインを有するインターフェロン類、インターロイキン類、繊維芽細胞成長因子、(プロ)ウロキナーゼ類、リンホトキシン、Tumor Necrosis Factor (TNF)、 β -ガラクトシダーゼ、貯蔵タンパク類、ストレプトアビシン、プロテインA、
5 プロテインG、Tissue Plasminogen Activator (TPA) またはそのムテインもしくは断片である第(1)項または第(2)項記載の製造法、
- (8) N末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドが、配列番号: 3で表されるアミノ酸配列を含有し、そのN末端にシステイン残基が付加した蛋白質またはペプチドである第(1)項または第(2)項記載の製造法、
- 10 (9) N末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドが配列番号: 3で表されるアミノ酸配列を含有し、そのN末端にシステイン残基が付加した蛋白であり、KiSS-1ペプチドが配列番号: 1で表されるアミノ酸配列を有するペプチドであり、製造されるKiSS-1ペプチドがC末端がアミドである配列番号: 1で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである請求項1または2
15 記載の製造法、
- (10) N末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドのN末端に、KiSS-1ペプチドを連結した融合蛋白質、ペプチドまたはその塩、
- (11) 配列番号: 3で表されるアミノ酸配列を含有し、そのN末端にシステイン残基が付加した蛋白質のN末端に、配列番号: 1で表されるアミノ酸配列
20 を含有するKiSS-1ペプチドを連結した第(10)項記載の融合蛋白質、ペプチドまたはその塩、
- (12) 第(10)項記載の融合蛋白質またはペプチドをコードするDNAを含有するDNA、
- (13) ①配列番号: 4で表される塩基配列または②配列番号: 5で表される
25 塩基配列を有する第(12)項記載のDNA、
- (14) 第(12)項記載のDNAを有するベクター、
- (15) 第(14)項記載のベクターを含有する形質転換体、および
- (16) FERM BP-6907で表示されるエシュリヒア・コリMM294 (DE3) / pTFC-KiSS-1を提供する。

さらに、本発明は、

(17) 次の①～④の工程；

- ①N末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドのN末端システインに、
K i S S - 1 ペプチドを連結した融合蛋白質またはペプチドをコードするD
NAを作製する、
②該DNAを有するベクターを作製する、
③該ベクターを保持する形質転換体を培養して融合蛋白質、ペプチドまたはそ
の塩を発現させる、
④発現された融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイン残基のアミノ
基側のペプチド結合の切断反応に付す、
からなる第(2)項記載の製造法を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の反応工程における反応メカニズムを示す。

図2は、実施例1で用いられたDNAフラグメントを示す。

図3は、実施例1で得られた2重鎖構成のヒトK i S S - 1 ペプチドを製造する模式図を示す。

図4は、実施例2で得られたプラスミドp T F C - K i S S - 1 の構築図を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法に用いられるK i S S - 1 ペプチドとしては、例えばWO 00 / 2 4 8 9 0 (国際特許出願 P C T / J P 9 9 / 0 5 9 0 5 号) に記載のヒトK i S S - 1 ペプチドが用いられ、具体的には、本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、N末端から第47～54番目のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチドなどがあげられる。

「本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、N末端から第47～54番目のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチド」としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、N末端か

ら第47～54番目のアミノ酸配列を含有し、かつ8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチドであればいかなるものであってもよいが、ペプチド活性（例えば、ペプチドと受容体の結合活性、ペプチドによって引き起こされる受容体発現細胞の細胞刺激活性など）などが、実質的に同じであることを意味する。具体的には、①本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列で表されるペプチド、②本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、N末端から第47～54番目のアミノ酸配列をC末端に有し、8乃至15個のアミノ酸残基からなるペプチドなどが用いられる。

より具体的には、K i S S - 1 ペプチドとしては、①本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列で表されるペプチド、②本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第40～54番目からなるアミノ酸配列で表されるペプチド、③本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第45～54番目からなるアミノ酸配列で表されるペプチド、④本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第46～54番目からなるアミノ酸配列で表されるペプチド、⑤本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第47～54番目からなるアミノ酸配列で表されるペプチドなどがあげられる。

上記K i S S - 1 ペプチドは、W O 0 0 / 2 4 8 9 0（国際特許出願 P C T / J P 9 9 / 0 5 9 0 5 号）に記載のレセプター蛋白質O T 7 T 1 7 5 に対し、リガンド活性を有する。

本明細書におけるペプチドはペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表されるペプチドのC末端は、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）、カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アルキルアミド（ $-\text{CONHR}$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。エステルまたはアルキルアミドのRとしては、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル、もしくは α -ナフチルメチルな

どの α -ナフチル- C_{1-2} アルキルなどの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などがあげられる。

本発明のK i S S - 1 ペプチドの塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）や酸（有機酸、無機酸）との塩が用いられるが、
5 とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

10 本発明の方法に用いられるN末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドとしては、特定されるものではない。そのN末端にシステインを有しない蛋白質またはペプチドの場合は、自体公知の方法によりN末端にシステインを有するようにすればよい。

該N末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドとしては、分子量が1
15 00～100000のものが好ましく、さらに、分子量が300～50000のものが好ましい。また、N末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドとしては、1～1000個のアミノ酸を有するものが好ましく、さらに3～500個のアミノ酸を有するものが好ましい。

該蛋白質またはペプチドとしては、例えばインターフェロン類、インターロ
20 イキン類、線維芽細胞成長因子（a F G F、b F G Fなど）等各種成長因子類、（プロ）ウロキナーゼ類、リンホトキシン、Tumor Necrosis Factor (T N F)、 β -ガラクトシターゼなどの酵素タンパク類、貯蔵タンパク類、ストレプトアビシン、プロテインA、プロテインG、Tissue Plasminogen Activator (T P A)、これらのムテイン又はこれらの一部（断片）などのN末端にシステインを有す
25 るものがあげられる。なかでも、線維芽細胞成長因子（a F G F、b F G Fなど）またはそのムテインまたはこれらの一部（断片）（例えば、b F G F C S 2 3 ムテインなど）などが好ましく用いられる。

b F G F C S 2 3 ムテインとしては、例えば、
Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Asp-Gly-Gly-Ser-Gly-Ala-Phe-Pro-Pro-Gly-His-Phe-

Lys-Asp-Pro-Lys-Arg-Leu-Tyr-Cys-Lys-Asn-Gly-Gly-Phe-Phe-Leu-Arg-Ile-
His-Pro-Asp-Gly-Arg-Val-Asp-Gly-Val-Arg-Glu-Lys-Ser-Asp-Pro-His-Ile-
Lys-Leu-Gln-Leu-Gln-Ala-Glu-Glu-Arg-Gly-Val-Val-Ser-Ile-Lys-Gly-Val-
Ser-Ala-Asn-Arg-Tyr-Leu-Ala-Met-Lys-Glu-Asp-Gly-Arg-Leu-Leu-Ala-Ser-
5 Lys-Ser-Val-Thr-Asp-Glu-Cys-Phe-Phe-Phe-Glu-Arg-Leu-Glu-Ser-Asn-Asn-
Tyr-Asn-Thr-Tyr-Arg-Ser-Arg-Lys-Tyr-Thr-Ser-Trp-Tyr-Val-Ala-Leu-Lys-
Arg-Thr-Gly-Gln-Tyr-Lys-Leu-Gly-Ser-Lys-Thr-Gly-Pro-Gly-Gln-Lys-Ala-
Ile-Leu-Phe-Leu-Pro-Met-Ser-Ala-Lys-Ser (配列番号：3) で表されるアミノ
酸配列を含有し、そのN末端にシステイン残基が付加した蛋白質などがあげら
10 れる。

本発明方法で用いられる融合蛋白質（融合ペプチドを含む）をコードするD
NAは、(1)全塩基配列を化学的に合成してもよいし、(2)蛋白質をコードす
る塩基配列のN末端側にシステインをコードする塩基配列を配置し、さらにそ
のN末端側にK i S S - 1 ペプチドをコードする塩基配列を配置することに
15 より該DNAを構築してもよい。また、(3) 該ペプチドのフラグメントを得
るのが目的の場合には、所望のフラグメントの直後のアミノ酸残基をsite-
directed mutagenesis 等の手法でシステインに置換した該DNAを構築すれ
ばよい。

上記の(1)の場合の製造法としては、例えば、自体公知のホスホアミダイド
20 法、リン酸トリエステル法、ジエステル法、ハイドロジェンホスホネート法な
どを用いて、短いものなら一度に、長いものでは分割して合成した後にT4D
NAリガーゼを用いて連結して作成することが可能である。

上記の(2)の場合の製造法としては、例えば、C末端側の蛋白質をコードす
るDNAは、染色体またはcDNAから適当な制限酵素で切断し、ベクターに
25 連結して得るか、もしくはcDNAを取得する。しかる後にN末端がシステイ
ンになるように制限酵素で切断するか、もしくは、合成DNAを全蛋白もしくは
はその一部のDNAの5'-末端に結合しN末端がシステインになるように改
変する。その5'-末端に目的の蛋白質をコードするDNA (化学合成したもの
でも、生体よりクローニングしてきたものでもよい)をつなげる。

このようにして得られる融合蛋白質をコードするDNAの具体例としては、
例えば式

GGTACTTCTCTGTCTCCGCCGCCGAATCTTCTGGTTCTCGTCAGCAGCCGGGTCTGTCTGCTCCGCACTCT
CGTCAGATCCCGGCTCCGCAGGGTGTCTGTTCTGGTTCAGCGTGAAAAAGACCTGCCGAACAACCTGGAAC

5 TCTTTCGGTCTGCGTTTC-TGC または TGT-R (I)

[式中、Rは

CCCAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC

CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAACGGGGGCTTCTTCTGCGCATCCACCCGACGGCCGA

GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACCTTCAAGCAGAAGAG

10 AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGAGCGCTAATCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT

GGAAGATTACTAGCTTCTAAGTCTGTTACGGATGAGTGTTTCTTTTTTGAACGATTGGAA

TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA

CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT

CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGC (b F G F C S 2 3 ムテインの断片)からなる塩基

15 配列を示す。)で表わされるDNAなどがあげられる。

上記式 (I) はヒト (human) K i S S - 1 ペプチドを含有するペプチドを
コードするDNA塩基配列 (配列番号: 2) にシステインをコードする塩基配
列を介してRで示される塩基配列が結合していることを示す。

K i S S - 1 ペプチドをコードするDNAは、上記式 (I) で表されるDN
20 Aや配列番号: 15で表されるK i S S - 1 ペプチド成熟体をコードするDN
Aまたはその改変DNA (例えば、J. Natl. Cancer Inst., 88, 1731, 1996 ;
WO 98 / 3 9 4 4 8) を用いて、自体公知の方法に従って製造することもで
きる。

5'末端にATGを有し、その下流に該融合蛋白質をコードする領域、つい
25 で翻訳終止コドンを含むDNA (プラスミド) は、化学合成で、あるいは遺伝
子工学的に製造された公知の該蛋白質のcDNA、もしくは、染色体由来の該
蛋白質のDNAを加工することにより製造することができる。

本発明のN末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドのN末端にK
i S S - 1 ペプチドを連結した融合蛋白質またはペプチドをコードするDN

Aを、従来のDNA技術、例えば特定部位指向性変異誘発技術を用いて目的のムテインをコードするDNAに変換することができる。

特定部位指向性変異誘発技術は周知であり、アール・エフ・レイサー (Lather, R. F.) 及びジェイ・ピー・レコック (Lecoq, J. P.)、ジェネティック・エンジニアリング (Genetic Engineering)、アカデミックプレス社 (1983年) 第3
5 1-50頁に示されている。オリゴヌクレオチドに指示された変異誘発はエム・スミス (Smith, M.) 及びエス・ギラム (Gillam, S.)、ジェネティック・エンジニアリング：原理と方法、プレナムプムス社 (1981年) 3巻 1-32
頁に示されている。

10 該融合蛋白質をコードする領域を有するDNAを有するプラスミドを製造
するにあたって、ベクターとして用いられるプラスミドとしては、例えば大腸
菌 (Escherichia coli) 由来のpBR 322 [ジーン (Gene), 2, 95 (1977)], pBR 313 [ジーン, 2, 75 (1977)], pBR 324, pBR 3
25 [ジーン, 4, 124 (1978)], pBR 327, pBR 328 [ジーン,
15 9, 287 (1980)], pBR 329 [ジーン, 17, 79 (1982)], p
KY 2289 [ジーン, 3, 1 (1978)], pKY 2700 [生化学, 52,
770 (1980)], pACYC 177, pACYC 184 [ジャーナル・オブ・
バクテリオロジー (Journal of Bacteriology), 134, 1141 (1978)],
pRK 248, pRK 646, pDF [メソッズ・イン・エンジーモロジー
20 (Methods in Enzymology), 68, 268 (1979)], pUC 18, pUC 1
9 [ヤニシューペロンら, ジーン (Gene), 33, 103 (1985)] などがあ
げられる。また、バクテリオファージ、例えばλファージを使用したλgt系の
λgt・λC [Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71, 4579 (1974)],
λgt・λB [Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, 3461 (1975)],
25 λDam [ジーン, 1, 255 (1977)] やシャロンベクター [サイエンス,
(Science), 196, 161 (1977); ジャーナル・オブ・ビーロロジー
(Journal of Virology), 29, 555 (1979)], 繊維状ファージを使用
したmp系のmp18, mp19 [ヤニシューペロンら, ジーン (Gene), 33, 10
3 (1985)] ベクターなどもあげられる。

上記DNAは、ATGの上流にプロモーターを有しているのが好ましく、該プロモーターは、形質転換体の製造に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

例えば大腸菌(*Escherichia coli*)ではtrpプロモーター、lacプロモーター、
5 rec Aプロモーター、 λ P Lプロモーター、lppプロモーター、T 7プロモーターなど、枯草菌(*Bacillus subtilis*)ではS P O 1プロモーター、S P O 2プロモーター、penPプロモーターなど、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)ではP H O 5プロモーター、P G Kプロモーター、G A Pプロモーター、A D Hプロモーターなど、動物細胞ではS V 4 0由来のプロモーターなどがあげられる。
10 必要によりS D (シヤインアンドダルガーノ)配列をプロモーターの下流に挿入してもよい。

T 7プロモーターの系を用いる場合には、T 7プロモーターとしては、T 7 DNA上で見い出されている17種のプロモーター [J. L. Oakley ら, Proc. Natl. Acad. Sci, U. S. A, 74: 4266-4270 (1977), M. D. Rosa,
15 Cell 16: 815-825 (1979), N. Panayotatos ら, Nature, 280: 35 (1979), J. J. Dunn ら, J. Mol. Biol., 166: 477-535 (1983)] のいずれでもよいが ϕ 10プロモーター [A. H. Rosenberg ら, Gene, 56: 125-135 (1987)] が好ましい。

転写ターミネーターとしては、大腸菌の系で作動するターミネーター、好ましくはT ϕ ターミネーター [F. W. Studier ら, J. Mol. Biol., 189: 113-130 (1986)] が用いられる。
20

T 7 RNAポリメラーゼ遺伝子としてはT 7遺伝子 [F. W. Studier ら, J. Mol. Biol., 189: 113-130 (1986)] をあげることが出来る。

ベクターは上記ベクターにT 7プロモーター、T 7ターミネーターを組み込んで構築されるのが好ましく、このようなベクターとしては、pE T-1, pE T-2, pE T-3, pE T-4, pE T-5 [A. H. Rosenberg, Gene 56: 125-135 (1987)]、pT B 9 6 0-2 [E P-A-4 9 9 9 0] などをあげることができるが、好ましくはpT B 9 6 0-2が用いられる。
25

本発明の形質転換体は、上記方法で得られる発現用プラスミドを自体公知の

方法〔例、コーエンS, N, ら, プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.), 69, 2110 (1972)〕で宿主を形質転換することにより製造することができる。

形質転換される微生物の宿主としては、例えば、エシエリシア(Escherichia) 5 属菌, バチリス(Bacillus)属菌, 酵母, 動物細胞などがあげられる。

上記エシエリシア属菌の例としては、エシエリシア・コリ(E. coli)があげられ、具体的にはエシエリシア・コリ(Escherichia coli) K12 DH1〔プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.), 60, 160(1968)〕, JM-103〔ヌクレック・アシッズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9, 309(1981)〕, JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology), 120, 517(1978)〕, HB101〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41, 459(1969)〕, C600〔ジェネティックス(Genetics), 39, 440(1954)〕, N483 10 0〔セル(Cell), 25, 713(1981)〕, K-12 MM294〔プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス, 73, 4174(1976)〕 BL-21などがあげられる。

上記バチルス属菌としては、例えばバチルス・サチルス(Bacillus subtilis) があげられ、具体的にはバチルス・サチルスMI114(ジーン, 24, 25 20 5(1983)), 207-21〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(Journal of Biochemistry), 95, 87(1984)〕などがあげられる。

上記酵母としては、例えばサッカロマイセス・セレビシアエ(Saccharomyces cerevisiae)があげられ、具体的には、サッカロマイセス・セレビシアエAH 22〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929(1978)〕, XS 25 B52-23C〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 2173(1980)〕, BH-641A(ATCC 28339), 20B-12〔Genetics, 85, 23(1976)〕, GM3C-2〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2258(1981)〕などがあげられる。

動物細胞としては、例えばサル細胞COS-7〔セル(Cell), 23, 175

(1981)], Vero [(日本臨床 21, 1209(1963)], チャイニーズハムスター細胞CHO [ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディスン(J. Exp. Med.), 108, 945(1985)], マウスL細胞 [ジャーナル・オブ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート(J. Nat. Cancer Inst.),
5 4, 165(1943)], ヒトFL細胞 [プロシーディングス・オブ・ザ・ソサエティ・フォー・エクスperimental・バイオロジー・アンド・メディスン(Proc. Soc. Exp. Biol. Med.), 94, 532(1957)], ハムスターC細胞などがあげられる。

T7プロモーターの系を用いる場合には、その形質転換体の宿主としては、
10 T7RNAポリメラーゼ遺伝子(T7遺伝子1)(F. W. Studierら, J. Mol. Biol. 189: 113-130(1986))を組み込んだ大腸菌株、例えばMM294, DH-1, C600, JM109, BL21, あるいはT7RNAポリメラーゼ遺伝子(T7遺伝子1)を他のプラスミドと共に組込んだ大腸菌株などが用いられる。好ましくはT7遺伝子1を組み込んだ入ファージが溶原化した
15 MM294株およびBL21株が用いられる。この場合T7遺伝子1のプロモーターとしては、イソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド(IPTGと略することがある。)で発現が誘導されるlacプロモーターが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・
20 ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン(Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を宿主として形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・
25 ジェネラル・ジェネティックス(Molecular and General Genetics), 168, 111(1979)など公知の方法に従って行なうことができる。

酵母菌を宿主として形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・
ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75, 1929(1978)などの公知の方法に従っ

て行なうことができる。

動物細胞を宿主として形質転換するには、例えば、ヴィーロロジー (Virology, 52, 456 (1973) などの公知の方法に従って行なうことができる。

融合蛋白は、上述の形質転換体を培地に培養し、産生された融合蛋白を採取
5 することにより製造することができる。

培地のpHは約6～8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミ
ノ酸を含むM9培地 [Miller, ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・
モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular
10 Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972)] が
好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば
3β-インドリル アクリル酸やイソプロピルβ-D-チオガラクトピラノ
シド (IPTG) のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時
15 間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行
い、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えばバークホ
ールダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングス・オブ・
20 ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA,
77, 4505 (1980)] があげられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好まし
い。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行い、必要に応じて通気
や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば約0.
25 2～20%好ましくは約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエン
ス (Science), 122, 501 (1952)] , DME培地 [ヴィロロジー (Virology), 8,
396 (1959)] , RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・
メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical
Association), 199, 519 (1967)] , 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・

ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1 (1950)] などがあげられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30～40℃、培養時間は約15～60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 5 融合蛋白質は、上記形質転換体を培養し、培養物中に該融合蛋白質を生成、蓄積せしめ、これを採取することにより製造することができる。

培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー, J., エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス(Experiments in Molecular Genetics), 431-433 (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972)], 2×YT培地〔メシング, メソッド・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 101, 20 (1983)] LB培地などがあ
10 げられる。

培養は通常約15～43℃で約3～24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えてもよい。

- 15 λcItsリプレッサーと、λPLプロモーターを含有する発現ベクターとを有する組換え体を使用する場合には、培養は約15～36℃好ましくは約30℃～36℃の温度で行い、λcItsリプレッサーの不活化は約37℃～42℃で行うのが好ましい。またrecAプロモーターをより効率良く働かせるため、すなわちrecA遺伝子発現抑制機能を低下せしめるため、必要によりマイ
20 トマイシンC、ナルジキシン酸などのような薬剤を添加したり、紫外線を照射する、あるいは培養液のpHをアルカリ側に変化させてもよい。

T7プロモーターの系を用いている場合には、(1)lacプロモーターの下流に連結されているT7遺伝子(RNAポリメラーゼ遺伝子)を発現させる時はIPTGなどを添加する、もしくは(2)λPLプロモーターの下流に連結され
25 ているT7遺伝子(RNAポリメラーゼ遺伝子)を発現させる時は培養の温度を上昇させることなどにより、生成するT7ファージRNAポリメラーゼ1により特異的にT7プロモーターを作動させる。

培養後、公知の方法で菌体を集め、例えば緩衝液に懸濁したのち、例えば、蛋白変性剤処理、超音波処理やリゾチームなどの酵素処理、ガラスビーズ処理、

フレンチプレス処理、凍結融解処理などを行って菌体を破碎し、遠心分離など公知の方法によって上清を得る。

上記により得られた上清から、融合蛋白質を単離するには、通常知られている蛋白質の精製法に従えばよい。例えば、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、電気泳動等を適切に組み合わせて行うことができる。また、該融合蛋白質は、精製することなく、あるいは部分精製の状態で、次の反応工程に進んでもよい。

次に、このようにして得られる融合蛋白質やペプチドをシステイン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付す。該切断反応としては、例えば、S-シアノ化反応次いで加水分解反応があげられる。K i S S - 1 ペプチドのアミドまたはその塩を最終物として得る場合には、該切断反応としては、例えば、S-シアノ化反応次いでアンモノリシスを行うことがあげられる。該S-シアノ化反応は、原料化合物に、S-シアノ化試薬を作用させることにより行なう。

15 S-シアノ化試薬としては例えば2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸(NTCB)、1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジウム塩(DMAP-CN)、CN⁻イオンなどがあげられる。該S-シアノ化試薬の量は、モル数で全チオール基の約2倍から50倍量であればよく、好ましくは約5倍~10倍量である。

20 反応温度は約0℃~80℃の間であれば、いずれでもよく、約0℃~50℃の間がより好ましい。用いる溶媒としては、S-シアノ化試薬と反応しないものであれば、いずれの緩衝液でもよいが、例えば、トリス-塩酸緩衝液、トリス-酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、などがあげられる。また、有機溶媒は、S-シアノ化試薬と反応しないものであれば、存在していてもよい。

25 該反応は、pH 1~12の間で行なうのが良い。特に、NTCBを用いる場合にはpH 7~10、DMAP-CNを用いる場合にはS-S交換反応を防止するため、pH 2~7の間が好ましい。また、反応液中には、塩酸グアニジン等の変性剤が存在していてもよい。

上記アンモノリシスまたは加水分解反応としては、例えばアルカリ処理に付

すことがあげられる。

該アルカリ処理としては、原料化合物を含有する水溶液のpHを7～14に、調整することにより行なわれる。

該pHの調整は、例えばアンモニア、水酸化ナトリウム、後述するアミノ化合物、トリツマベース（トリス〔ヒドロキシメチル〕ーアミノメタン）、リン酸第2ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化バリウム等の溶液を原料化合物を含有する水溶液に適当量加えて行うが特にアンモニアなどが好ましい。

上記反応の際の溶液の濃度としては、たとえばアンモニアまたはアミノ化合物の場合は約0.01～15N好ましくは約0.1～3N、水酸化ナトリウムの場合は約0.01～2N好ましくは約0.05～1N、トリツマベースの場合は約1mM～1M好ましくは約20mM～200mM、リン酸第2ナトリウムの場合は約1mM～1M好ましくは約10mM～100mM、水酸化カリウムの場合は約0.01～4N好ましくは約0.1～2Nがあげられる。反応温度は約－20℃～80℃の間であればいずれでもよく、約－10℃～50℃の間がより好ましい。

反応時間は、好ましくは、Sーシアノ化反応は約1～60分好ましくは約15～30分が、加水分解反応は約5分～100時間好ましくは10分～15時間が、アンモノリシスは約5分～24時間好ましくは約10～180分があげられる。

該アミノ化合物としては、例えば、式 $R^1-(NR^2)-H$ （式中、 R^1 および R^2 は同一または異なって、(i)水素原子、(ii) C_{1-20} アルキル基、 C_{3-8} シクロアルキル基、 C_{6-14} アリール(aryl)基または C_{6-14} アリール- C_{1-3} アルキル基（これらは置換基を有していないかあるいは1～3個のアミノ基、水酸基などを炭素原子上に有していてもよい）、(iii)置換されていてもよいアミノ基、(iv)水酸基または C_{1-6} アルコキシ基を示す。）で表される化合物などがあげられる。

上記のSーシアノ化およびアンモノリシスまたは加水分解により、〔図1〕に示される反応が起こると考えられる。

本発明の製造法で得られるK i S S－1ペプチドのC末端は、前記したよう

にアミド ($-\text{CONH}_2$)、カルボキシル基、カルボキシレート ($-\text{COO}^-$)、アルキルアミド ($-\text{CONHR}$) またはエステル ($-\text{COOR}$) であってもよく、なかでもアミド、カルボキシル基 ($-\text{COOH}$) またはアルキルアミドが好ましく、特にアミドまたはアルキルアミドが好適である。具体的には、本発明の製造法で得られる K i S

5 S-1 ペプチドの C 末端は、〔図 1〕に示される $-\text{CO}-\text{X}$ であってよい。X は $\text{R}^1-(\text{NR}^2)-$ (式中、各記号は前記と同意義を示す。) または OH を示す。

上記 C_{1-20} アルキルの例としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、sec-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、

10 1-エチルペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノナニル、デカニル、ウンデカニル、ドデカニル、テトラデカニル、ペンタデカニル、ヘキサデカニル、ヘプタデカニル、オクタデカニル、ノナデカニルおよびエイコサニルなどがあげられる。

上記 C_{3-8} シクロアルキルの例としては、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル

15 などがあげられる。

上記 C_{6-14} アリールの例としては、フェニル、ナフチル、アンスリル、フェナンスリル、アセナフチレニルなどがあげられる。

上記 C_{6-14} アリール- C_{1-3} アルキルの例としては、例えばベンジル、フェネチル、3-フェニルプロピル、(1-ナフチル)メチル、(2-ナフチル)

20 メチルなどがあげられる。

上記 C_{1-6} アルコキシの例としては、例えばメトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシなどがあげられる。

上記 (iii) の置換されていてもよいアミノの置換基の例としては、例えばアミノ酸、2~10 個のアミノ酸からなるペプチドなどがあげられる。

25

上記アミノ酸としては、L-体でもD-体でもよく、その例としては、例えば、Ala, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Met, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val などがあげられる。

上記ペプチドの例としては、例えば、H-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅, H-

Val-Ala-Leu-D-Ala-Ala-Pro-Leu-Ala-Pro-Arg-OH などがあげられる。

上記した中でも、 R^2 としては水素原子、 R^1 としては水素原子または C_{1-20} アルキル基が好ましい。

上記アンモノリシス反応において、アンモニアまたはアミノ化合物を用いた
5 場合には、対応するアミド体を得られる。

切り出された目的ペプチドを単離するには、通常知られているペプチドの精
製法に従えばよい。例えば、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、高
速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水クロマ
トグラフィー、薄層クロマトグラフィー、電気泳動等を適宜組み合わせて行うこ
10 とができる。

このようにして得られるK i S S - 1 ペプチドまたはその塩は、公知の精
製手段、例えば、抽出、塩析、分配、再結晶、クロマトグラフィーなどによ
り、反応溶液から単離・精製することもできるが、好ましい例として、例え
ば、S P - セファロース（ファルマシア バイオテク（株））、D E A E - 5
15 P W（東ソー（株））、あるいはS P - 5 P W（東ソー（株））を介したイオン
交換クロマトグラフィーなどによる精製法があげられる。

得られるK i S S - 1 ペプチドまたはその塩は、必要によりこれを凍結乾燥
により粉末とすることもできる。凍結乾燥に際しては、ソルビトール、マンニ
トール、デキストロース、マルトース、トレハロース、グリセロールなどの安
20 定化剤を加えることができる。

本発明の方法で製造されるK i S S - 1 ペプチドまたはその塩は滅菌水、ヒ
ト血清アルブミン(H S A)、生理食塩水その他公知の生理学的に許容される担
体と混合することができ、哺乳動物（例、ヒト）に対して非経口的に又は局所
に投与することができる。たとえば、その1日投与量は1人あたり、約0.0
25 1 mg - 50 mg、好ましくは、約0.1 mg - 10 mgを、静注または筋注などによ
り非経口的に投与することができる。

本発明の方法で製造されるK i S S - 1 ペプチドまたはその塩を含有する
製剤は、塩、希釈剤、アジュバント、他の担体、バッファー、結合剤、界面活
性剤、保存剤のような生理的に許容される他の活性成分も含有していてもよい。

非経口的投与製剤は、滅菌水溶液又は生理学的に許容される溶媒との懸濁液アンプル、または生理学的に許容される希釈液で用時希釈して使用しうる滅菌粉末(通常ペプチド溶液を凍結乾燥して得られる)アンプルとして提供される。

5 本発明の製造法によって得られるK i S S - 1 ペプチドまたはその塩は癌転移抑制活性を有するため、あらゆる癌(例えば、肺癌、胃癌、肝癌、膀胱癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、乳癌等)の予防または治療薬として有用である。

また、K i S S - 1 ペプチドまたはその塩は胎盤機能調節作用を有するため、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防または治療薬として有用である。

10

本明細書および図面において、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基、その他に関し略号で表示する場合、それらはIUPAC-IUB(Commission on Biochemical Nomenclature)による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を次にあげる。また、アミノ酸などに関し光学異性体がありうる場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

15

DNA : デオキシリボ核酸

A : アデニン

T : チミン

20 G : グアニン

C : シトシン

RNA : リボ核酸

EDTA : エチレンジアミン四酢酸

Gly : グリシン

25 Ala : アラニン

Val : バリン

Leu : ロイシン

Ile : イソロイシン

Ser : セリン

	Thr	: スレオニン
	Met	: メチオニン
	Glu	: グルタミン酸
	Asp	: アスパラギン酸
5	Lys	: リジン
	Arg	: アルギニン
	His	: ヒスチジン
	Phe	: フェニールアラニン
	Tyr	: チロシン
10	Trp	: トリプトファン
	Pro	: プロリン
	Asn	: アスパラギン
	Gln	: グルタミン
	Cys	: システイン
15	Asx	: アスパラギンまたはアスパラギン酸
	Glx	: グルタミンまたはグルタミン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号：1]

20 K i S S - 1 ペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：2]

K i S S - 1 ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：3]

b F G F C S 2 3 ムテインのアミノ酸配列を示す。

25 [配列番号：4]

式 (I) で表される融合蛋白質をコードするDNAの断片の塩基配列を示す。

[配列番号：5]

式 (I) で表される融合蛋白質をコードするDNAの断片の塩基配列を示す。

[配列番号：6]

b F G F C S 2 3 ムテインの断片をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：7]

実施例1においてK i S S - 1 ペプチドの構造遺伝子の調製に用いたオリゴマーの塩基配列を示す。

5 [配列番号：8]

実施例1においてK i S S - 1 ペプチドの構造遺伝子の調製に用いたオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：9]

10 実施例1においてK i S S - 1 ペプチドの構造遺伝子の調製に用いたオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：10]

実施例1においてK i S S - 1 ペプチドの構造遺伝子の調製に用いたオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：11]

15 実施例1においてK i S S - 1 ペプチドの構造遺伝子の調製に用いたオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：12]

実施例1においてK i S S - 1 ペプチドの構造遺伝子の調製に用いたオリゴマーの塩基配列を示す。

20 [配列番号：13]

実施例1においてK i S S - 1 ペプチドの構造遺伝子の調製に用いたオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：14]

25 実施例1においてK i S S - 1 ペプチドの構造遺伝子の調製に用いたオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：15]

K i S S - 1 ペプチド成熟体のアミノ酸配列を示す。

以下に実施例をあげて、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれら

に限定されるものではない。

実施例

実施例1 K i S S - 1 ペプチドをコードするDNAの製造

(a) DNA断片の合成

- 5 [図2] に示す8種のDNA断片 (#1、#4、#5、#8 : アマシャム・ファルマシア・バイオテク社、#2、#3、#6、#7 : キコーテック社) (配列表中、配列番号 : 7 ~ 14) を用いて K i S S - 1 ペプチドの構造遺伝子を調製した (図3)。

(b) DNAオリゴマーのリン酸化

- 10 5' になるべき #1 (配列番号 : 7) および #8 (配列番号 : 14) を除いた6種のDNAオリゴマー (#2 ~ #7) (配列番号 : 8 ~ 13) 各々を、25 μ l のリン酸化反応液 [DNAオリゴマー 10 μ g, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 1 mM スペルミジン, 10 mM ジチオスレイトール (以後 DTT と略記), 0.1 mg/ml ウシ血清アルブミン (以後 BSA と略記), 1 mM ATP, 10 ユニット T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造)]
15 中で 37℃ 1 時間反応させ、各オリゴマーの 5' 末端をリン酸化した。フェノール処理を行った後、2 倍量のエタノールを加え、-70℃ に冷却した後、遠心で DNA を沈殿させた。

(c) DNAフラグメントの連結

- 20 上記 a) で得られた DNA フラグメントと #1 および #8 を合わせ 120 μ l とした。この混合液を 90℃ で 10 分間保った後、室温まで徐冷しアニーリングを行った。TaKaRa DNA Ligation Kit ver.2 (宝酒造) を用いてライゲーション反応を行った。アニーリング液 30 μ l に Ligation Kit II 液 30 μ l を加えよく混合した後、Ligation Kit I 液 60 μ l を加え、37℃、1 時間
25 反応させ、ライゲーションを行った。フェノール処理を行った後、水層を回収し 2 倍量のエタノールを加え、-70℃ に冷却した後、遠心で DNA を沈殿させた。この様にして得られた DNA フラグメントを T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造) によるリン酸化を行った後、以下の (d) に供した。

(d) K i S S - 1 ペプチド発現ベクターの構築 [図4]

発現用ベクターとしては pTFC (特開 2000-270871、特願平 11-080303 号) を Nde I および A v a I (宝酒造) で 37℃ 4 時間消化した後、1%アガロースゲル電気泳動により 4.4 kb の DNA 断片を QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社) を用いて抽出し、25 μ l の T E 緩衝液に溶解した。この pTFC の Nde I、A v a I 断片と上記により調製した K i S S - 1 ペプチドの構造遺伝子を TaKaRa DNA ligation kit ver.2 (宝酒造) を用いてライゲーション反応を行った。

この反応液を 10 μ l 用いて大腸菌 J M 109 コンピテントセル (東洋紡) を形質転換し、10 μ g / m l のテトラサイクリンを含む L B 寒天培地上に播き、37℃ で 1 晩培養し、生じたテトラサイクリン耐性コロニーを選んだ。この形質転換体を L B 培地で一晩培養し、QIAprep8 Miniprep Kit (キアゲン社) を用いてプラスミド pTFC-KiSS-1 を調製した。この K i S S - 1 構造遺伝子部分の塩基配列をアプライドバイオシステムズ社モデル 377 DNA シーケンサーを用いて確認した。プラスミド pTFC-KiSS-1 で大腸菌 M M 294 (D E 3) を形質転換し、K i S S - 1 ペプチド - C S 23 融合タンパク質発現株 M294 (DE3) / pTFC-KiSS-1 を得た (図 4)。

Escherichia coli M M 294 (DE3) / pTFC-KiSS-1 は受託番号 FERM BP-6907 で 1999 年 10 月 4 日付で通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託された。また 1999 年 9 月 16 日付で受託番号 IF016321 として財団法人発酵研究所 (IFO) に寄託された。

(d) K i S S - 1 ペプチドの製造

M M 294 (D E 3) / p T F C - K i S S - 1 を 5.0 m g / L のテトラサイクリンを含む L B 培地に 1 L (1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム) を用いて 2 L 容フラスコ中で 37℃、8 時間振とう培養した。得られた培養液を 19 L の主発酵培地 (1.68%リン酸 1 水素ナトリウム、0.3%リン酸 2 水素カリウム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.025%硫酸マグネシウム、0.02%消泡剤、0.00025%硫酸第 1 鉄、0.0005%塩酸チアミン、1.5%ブドウ糖、1.5%カザミノ酸) を仕込んだ 50 L 容発酵槽へ移植して、30℃ で通気攪拌を開始

した。培養液の濁度が500クレット単位になったところで、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドの最終濃度が12mg/Lになるように添加し、さらに6時間培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離し、約600gの湿菌体を取得し、-80℃で保存した。

5 実施例2

実施例1で得た菌体100gに10mM EDTA (pH 6.0) 溶液300mlを加え、超音波処理(BRANSON SONIFIER MODEL 450)した後、遠心分離(10000rpm、60分)を行った。上澄液はプールし、沈殿物を用いて再び同様の操作を行った。プールした上澄液はpH 6.0に調整し、50mM リン酸緩衝液(pH 6.0)で平衡化した AF-Heparin Toyopearl 650Mカラム(11.3cm ID×13.5cm L、東ソー)に通液し、吸着、洗淨した後、0-100%B (B=50mM リン酸緩衝液+2M NaCl、pH 6.0)の段階勾配で溶出を行い、KiSS-1ペプチド-CS23融合タンパク質画分を得た(100分間の勾配で溶出時間約100分の画分)。この溶出液をペリコンミニカセット(ミリポア社)で濃縮した後、さらに0.1M酢酸を加えながら濃縮を行い、KiSS-1ペプチド-CS23融合タンパク質の0.1M酢酸溶液を得た。この溶液に最終濃度6Mとなるように尿素を添加した後、DMAP-CN (1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate) 約100mgを加えて、室温で15分間反応した。反応終了後、反応液を50mMリン酸1カリウムで平衡化した Sephadex G-25カラム(46mm ID×600mm L、ファルマシア)に通液し、平衡化に用いた50mMリン酸1カリウムを6ml/minの流速で展開し、S-シアノ化されたKiSS-1ペプチド-CS23融合タンパク質画分を得た。この溶出液をペリコンミニカセット(ミリポア社)で濃縮・脱塩を行い、KiSS-1ペプチド-CS23融合タンパク質の脱塩液を得た。この脱塩液に最終濃度6Mとなるように尿素を添加した後、さらに、3Mアンモニア濃度となるように25%アンモニア水を加え、室温で15分間反応した。反応終了後、酢酸でpH 6.0に調整し、KiSS-1ペプチド(アミド体)を得た。この反応液を50mMリン酸1カリウムで平衡化した Sephadex G-25カラム(46mm ID×60

0 mmL)に通液し、平衡化に用いた50 mMリン酸1カリウムを6 ml/minの流速で展開し、KiSS-1ペプチド画分(アミド体)を得た。この画分を、3 M尿素を含む50 mM MES+3 M尿素(pH 4.5)で平衡化したSP-5 PW(21.5 mm ID×150 mmL、東ソー)に通液し、吸着、洗浄した後、
 5 0-30% B(B=50 mM リン酸緩衝液+1 M NaCl+3 M尿素、pH 4.5)の段階勾配で溶出を行い、KiSS-1ペプチド(アミド体)画分を得た(60分間の勾配で溶出時間約30分の画分)。この画分を、さらに0.1%トリフルオロ酢酸で平衡化したC4P-50(21.5 mm ID×300 mmL、昭和電工)に通液し、吸着、洗浄した後、20-50% B(B:80%アセト
 10 ニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸)の段階勾配で溶出を行い、KiSS-1ペプチド(アミド体)画分(60分間の勾配で溶出時間約45分の画分)をプールした後、凍結乾燥を行い、KiSS-1ペプチド(アミド体)凍結乾燥粉末約40 mgを得た。

実施例3 (KiSS-1ペプチドの特徴の決定)

15 a) アミノ酸組成分析

アミノ酸組成をアミノ酸分析計(日立L-8500A・Amino Acid Analyzer)を用いて決定した。その結果、KiSS-1ペプチドのDNA塩基配列から予想されるアミノ酸組成と一致した〔表1〕。

〔表1〕

アミノ酸	1モル当たりの KiSS-1ペプチドの塩基配列	
	残基数	から予測される値
Asx	3.5	4
Thr*)	0.9	1
Ser*)	7.3	8
25 Glx	7.0	7
Pro	8.1	8
Gly	4.9	5
Ala	2.9	3
Cys	0	0

	V a l	2. 0	2
	M e t	0	0
	I l e	0. 9	1
	L e u	5	5
5	T y r	1. 0	1
	P h e	1. 9	2
	H i s	1. 1	1
	L y s	1. 0	1
	A r g	3. 8	4
10	T r p	0. 4	1

酸加水分解(6N HCl-4%thioglycolic acid 24-48hr加水分解の平均値)

*) 0時間に外挿した値

b) N末端アミノ酸配列分析

N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー(PEアプライドバイオ
15 システムズ モデル492)を用いて決定した。その結果、KiSS-1ペプ
チドのDNA塩基配列から予想されるN末端アミノ酸配列と一致した〔表2〕。
〔表2〕

N末端アミノ酸配列分析

20	残基 No.	検出された	KiSS-1ペプチドの塩基配列
		PTH*)-アミノ酸	から予測されるアミノ酸
	1	G l y (28)	G l y
	2	T h r (24)	T h r
	3	S e r (12)	S e r
25	4	L e u (14)	L e u
	5	S e r (9)	S e r
	6	P r o (16)	P r o
	7	P r o (17)	P r o
	8	P r o (14)	P r o

9	G l u (7)	G l u
10	S e r (4)	S e r
11	S e r (6)	S e r

100 pmol を用いた。

5 *) フェニールチオヒダントイン。

c) C末端アミノ酸分析

C末端アミノ酸をアミノ酸分析計 (日立 L-8500A Amino Acid Analyzer) を用いて分析したが、C末端はアミド化されているため、不検出であった [表3]。

10 [表3]

C末端アミノ酸分析

	C末端アミノ酸	回収率
KISS-1ペプチド		(%)
15	P h e	—

気相ヒドラジン分解法 (100℃, 3.5hr)。

実施例4 (生物活性測定)

実施例2で取得したヒト K i S S - 1 ペプチドを用いて、WO 99/33976の実施例3に記載の方法 (細胞内カルシウムイオン濃度上昇活性) で活性を測定し、ヒト胎盤抽出液より精製した標品と同等の活性を有することを確認した。

20

実施例5 (K i S S - 1 ペプチド (非アミド体) の製造)

実施例1で得た菌体 100g に 10mM EDTA (pH 6.0) 溶液 300ml を加え、超音波処理 (BRANSON SONIFIER MODEL 450) した後、遠心分離 (10000rpm, 60分) を行った。上澄液はプールし、沈殿物を用いて再び同様の操作を行った。プールした上澄液は pH 6.0 に調整し、50mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した AF-Heparin Toyopearl 650M カラム (11.3cm ID × 13.5cm L, 東ソー) に通液し、吸着、洗淨した後、0-100% B (B = 50mM リン酸緩衝液 + 2M NaCl, pH 6.0) の段階勾配で溶出を行い、K i S S - 1 ペプチド-C S 2 3 融合タン

25

パク質画分を得た（100分間の勾配で溶出時間約100分の画分）。この溶出液をペリコンミニカセット（ミリポア社）で濃縮した後、さらに0.1M酢酸を加えながら濃縮を行い、KiSS-1ペプチド-CS23融合タンパク質の0.1M酢酸溶液を得た。この溶液に最終濃度6Mとなるように尿素を添加した後、DMA P-CN 約100mgを加えて、室温で15分間反応した。反応終了後、反応液を50mMリン酸1カリウムで平衡化した Sephadex G-25カラム（46mm ID×600mmL、ファルマシア）に通液し、平衡化に用いた50mMリン酸1カリウムを6ml/minの流速で展開し、S-シアノ化されたKiSS-1ペプチド-CS23融合タンパク質画分を得た。この溶出液をペリコンミニカセット（ミリポア社）で濃縮・脱塩を行い、KiSS-1ペプチド-CS23融合タンパク質の脱塩液を得た。この脱塩液に最終濃度6Mとなるように尿素を添加した後、さらに、0.05N NaOH濃度となるように1N NaOHを加え、0℃で15分間反応した。反応終了後、酢酸でpH6.0に調整し、KiSS-1ペプチド（非アミド体）を得た。この反応液を50mMリン酸1カリウムで平衡化した Sephadex G-25カラム（46mm ID×600mmL）に通液し、平衡化に用いた50mMリン酸1カリウムを6ml/minの流速で展開し、KiSS-1ペプチド画分（非アミド体）を得た。この画分を、3M尿素を含む50mM MES+3M尿素（pH4.5）で平衡化したSP-5PW（21.5mm ID×150mmL、東ソー）に通液し、吸着、洗浄した後、0-30%B（B=50mMリン酸緩衝液+1M NaCl+3M尿素、pH4.5）の段階勾配で溶出を行い、KiSS-1ペプチド（非アミド体）画分を得た（60分間の勾配で溶出時間約30分の画分）。この画分を、さらに0.1%トリフルオロ酢酸で平衡化したC4P-50（21.5mm ID×300mmL、昭和電工）に通液し、吸着、洗浄した後、20-50%B（B：80%アセトニトリル／0.1%トリフルオロ酢酸）の段階勾配で溶出を行い、KiSS-1ペプチド（非アミド体）画分（60分間の勾配で溶出時間約45分の画分）をプールした後、凍結乾燥を行い、KiSS-1ペプチド（非アミド体）凍結乾燥粉末約30mgを得た。

実施例6 （KiSS-1ペプチドの特徴の決定）

a) アミノ酸組成分析

アミノ酸組成をアミノ酸分析計（日立 L-8500A Amino Acid Analyzer）を用いて決定した。その結果、KiSS-1 ペプチドのDNA塩基配列から予想されるアミノ酸組成と一致した〔表4〕。

5 〔表4〕

アミノ酸組成分析

	アミノ酸	1 モル当たりの	KiSS-1 ペプチドの塩基配列
		残 基 数	から予測される値
10	A s x	3. 3	4
	T h r *)	0. 9	1
	S e r *)	7. 0	8
	G l x	7. 0	7
	P r o	7. 8	8
15	G l y	4. 7	5
	A l a	2. 8	3
	C y s	0	0
	V a l	1. 9	2
	M e t	0	0
20	I l e	0. 9	1
	L e u	5	5
	T y r	1. 0	1
	P h e	1. 9	2
	H i s	0. 9	1
25	L y s	0. 9	1
	A r g	3. 7	4
	T r p	0. 4.	1

酸加水分解(6N HCl-4%thioglycolic acid 24-48hr加水分解の平均値)

*) 0 時間に外挿した値

b) N末端アミノ酸配列分析

N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー（PEアプライドバイオシステムズ モデル492）を用いて決定した。その結果、KiSS-1ペプチドのDNA塩基配列から予想されるN末端アミノ酸配列と一致した〔表5〕。

5 〔表5〕

N末端アミノ酸配列分析

残基 No.	検出された		KiSS-1ペプチドの塩基配列 から予測されるアミノ酸
	PTH*)-アミノ酸 (pmol)		
1	G l y (17)		G l y
2	T h r (13)		T h r
3	S e r (11)		S e r
4	L e u (15)		L e u
5	S e r (8)		S e r
6	P r o (10)		P r o
7	P r o (11)		P r o
8	P r o (10)		P r o
9	G l u (5)		G l u
10	S e r (5)		S e r

100 pmolを用いた。

*) フェニールチオヒダントイン。

c) C末端アミノ酸分析

C末端アミノ酸をアミノ酸分析計（日立L-8500A Amino Acid Analyzer）を用いて分析した。〔表6〕。

〔表6〕

C末端アミノ酸分析

C末端アミノ酸

回収率

KISS-Iペプチド	(%)
P h e	48.5

気相ヒドラジン分解法(100℃, 3.5hr).

5 産業上の利用可能性

本発明の製造方法を用いると、例えば、あらゆる癌（例えば、肺癌、胃癌、肝癌、膀胱癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、乳癌等）、さらには絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防または治療薬などとして用いることができるペ

10 プチドを工業的かつ大量に製造できる。

請求の範囲

1. N末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドのN末端に、K i S S
- 1 ペプチドを連結した融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイン残
5 基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付すことを特徴とするK i S S
- 1 ペプチドまたはその塩の製造法。
2. N末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドのN末端に、K i S S
- 1 ペプチドを連結した融合蛋白質またはペプチドをコードするDNAを有
するベクターを保持する形質転換体を培養して融合蛋白質、ペプチドまたはそ
10 の塩を発現させ、発現された融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システ
イン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付すことを特徴とするK i
S S - 1 ペプチドまたはその塩の製造法。
3. K i S S - 1 ペプチドのC末端がアミドである請求項1または2記載の製
造法。
- 15 4. 切断反応がS-シアノ化反応、次いでアンモノリシスまたは加水分解反応
に付す反応である請求項1または2記載の製造法。
5. K i S S - 1 ペプチドが配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有する
ペプチドである請求項1または2記載の製造法。
6. K i S S - 1 ペプチドが、①配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末
20 端から第40～54番目からなるアミノ酸配列を有するペプチド、②配列番
号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第45～54番目からなるアミノ
酸配列を有するペプチド、③配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端か
ら第46～54番目からなるアミノ酸配列を有するペプチドまたは④配列番
号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第47～54番目からなるアミノ
25 酸配列を有するペプチドである請求項1または2記載の製造法。
7. N末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドが、N末端にシステ
インを有するインターフェロン類、インターロイキン類、繊維芽細胞成長因子、
(プロ)ウロキナーゼ類、リンホトキシン、Tumor Necrosis Factor (TNF)、
β-ガラクトシダーゼ、貯蔵タンパク類、ストレプトアビシン、プロテインA、

プロテインG、Tissue Plasminogen Activator (TPA) またはそのムテインもしくは断片である請求項1または2記載の製造法。

8. N末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドが、配列番号: 3 で表されるアミノ酸配列を含有し、そのN末端にシステイン残基が付加した蛋白質
5 またはペプチドである請求項1または2記載の製造法。

9. N末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドが配列番号: 3 で表されるアミノ酸配列を含有し、そのN末端にシステイン残基が付加した蛋白であり、K i S S - 1 ペプチドが配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列を有するペ
10 プチドであり、製造されるK i S S - 1 ペプチドがC末端がアミドである配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである請求項1または2記載の製造法。

10. N末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドのN末端に、K i S S - 1 ペプチドを連結した融合蛋白質、ペプチドまたはその塩。

11. 配列番号: 3 で表されるアミノ酸配列を含有し、そのN末端にシステ
15 イン残基が付加した蛋白質のN末端に、配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列を含有するK i S S - 1 ペプチドを連結した請求項10記載の融合蛋白質、ペプチドまたはその塩。

12. 請求項10記載の融合蛋白質またはペプチドをコードするDNAを含有するDNA。

20 13. ①配列番号: 4 で表される塩基配列または②配列番号: 5 で表される塩基配列を有する請求項12記載のDNA。

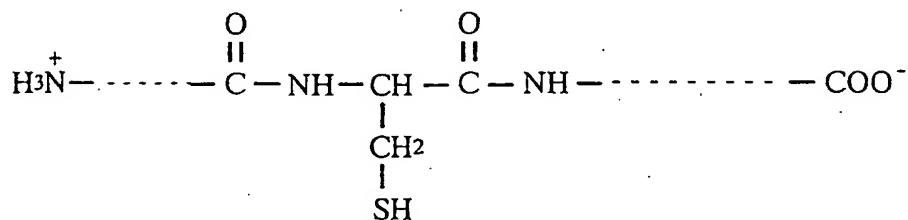
14. 請求項12記載のDNAを有するベクター。

15. 請求項14記載のベクターを含有する形質転換体。

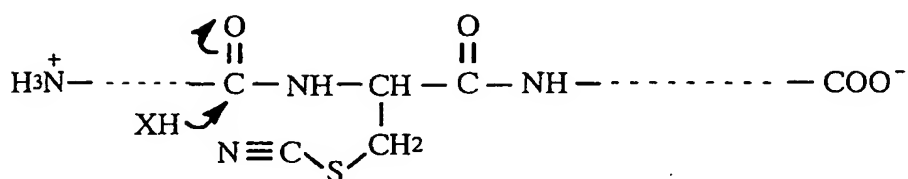
25 16. FERM BP-6907で表示されるエシュリヒア・コリMM294 (DE3) / pTFC-K i S S - 1。

図 1

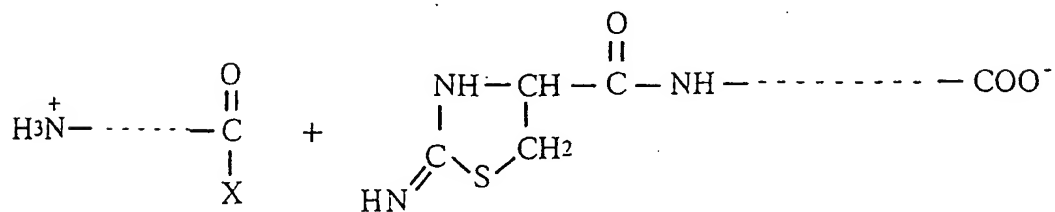
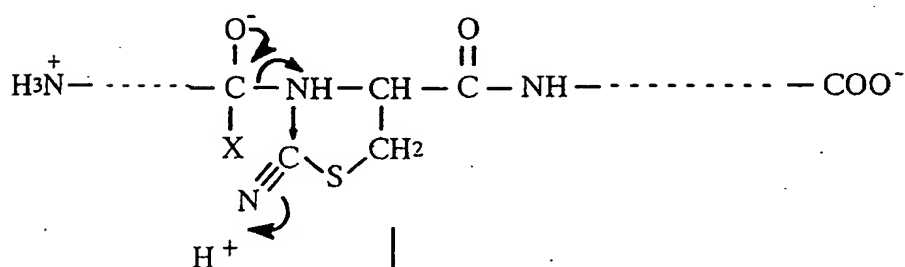
|←K i S S-1 ペプチド→| ← N末端にシステインを有するタンパク質 →|



シアノ化反応



アンモノリシスまたは加水分解



|←K i S S-1 ペプチド→|

☒ 2

#1 5' TATGGGTACTTCTCTGTCTCCGCCGCCGGAATCTTC

#2

5' TGGTTCTCGTCAGCAGCCGGGTCTGTCTGCTCCGCACTCTCGTCA

#3 5' GATCCCGGCTCCGCAGGGTGCTGTTCTGGTTCAGCGTGAAAA

#4

5' AGACCTGCCGAAC TACA ACTGGA ACTCTTT CGGTCTGCGTTTCTGCC

#5

5' ACGAGAACCAGAAGATTCCGGCGGCGGAGACAGAGAAGTACCCATA

#6

5' AGCCGGGATCTGACGAGAGTGCGGAGCAGACAGACCCGGCTGCTG

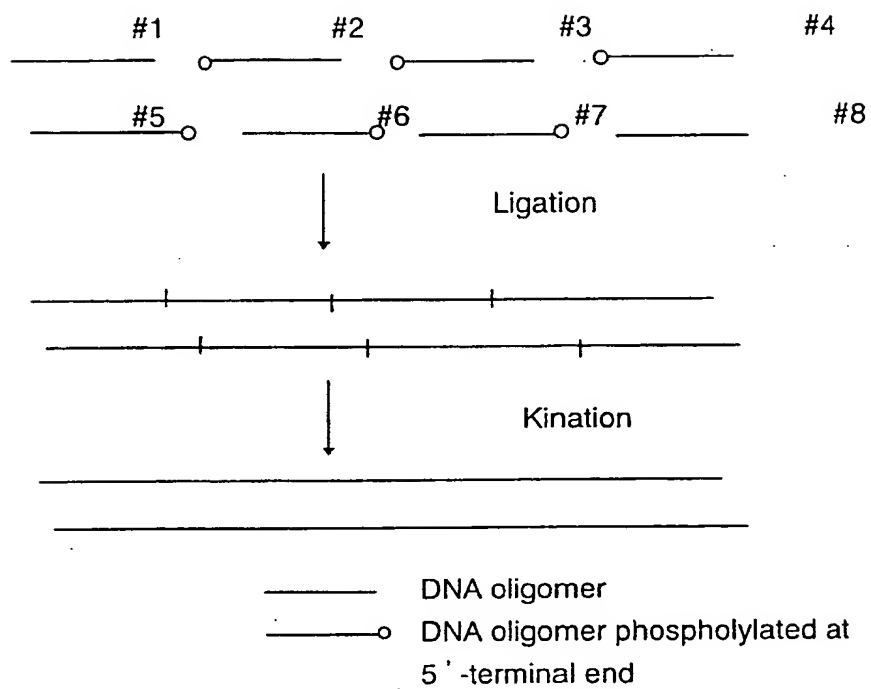
#7

5' CGGCAGGTCTTTTTT CACGCTGA ACCAGAACAGCACCCCTGCGG

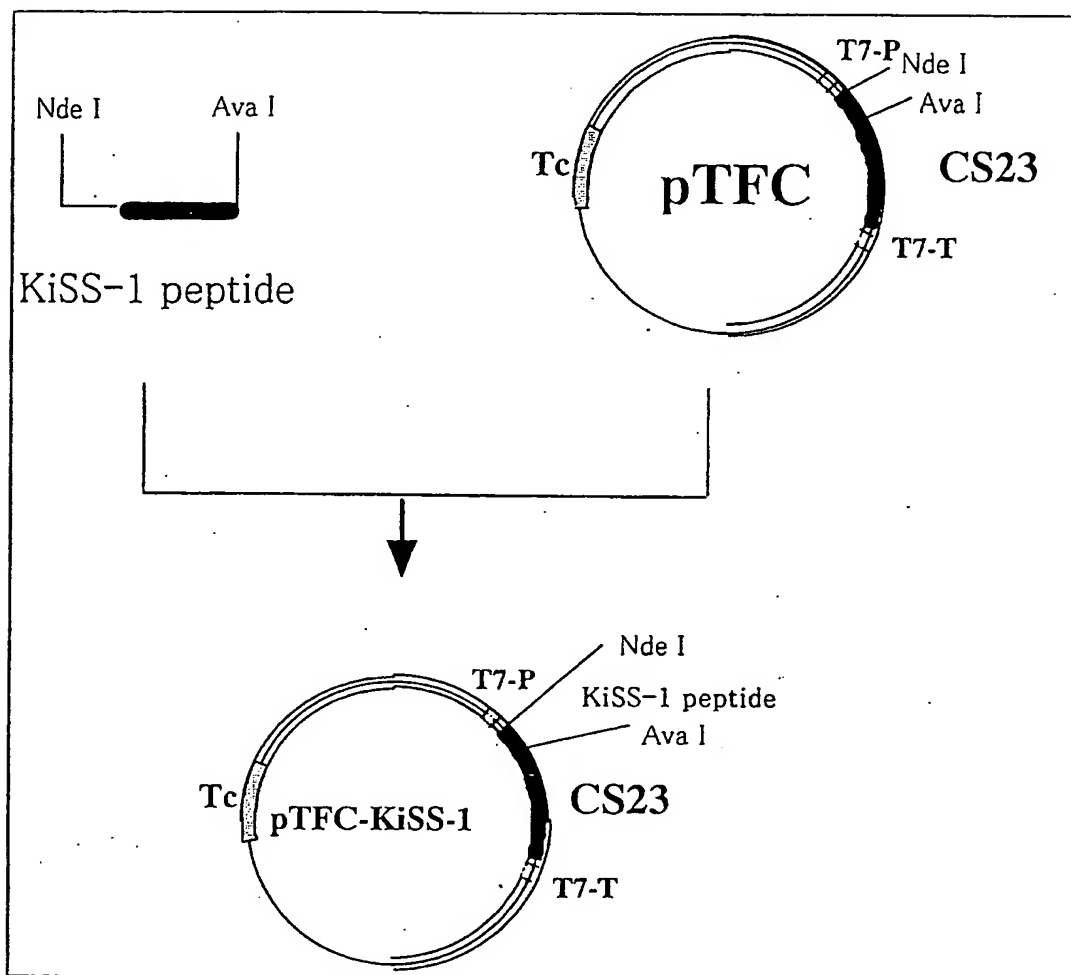
#8

5' TCGGGGCAGAAACGCAGACCGAAAGAGTTCCAGTTGTAGTT

3



4



SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Method of Production for KiSS-1 peptide

<130> 2677W00P

<150> JP11-358693

<151> 1999-12-17

<160> 15

<210> 1

<211> 54

<212> PRT

<213> Human

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide (-CONH₂) form

<400> 1

Gly Thr Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln

1 5 10 15

Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly

20 25 30

Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn

35 40 45

Ser Phe Gly Leu Arg Phe

50 54

<210> 2

<211> 162

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

GGTACTTCTC TGTCTCCGCC GCCGGAATCT TCTGGTTCTC GTCAGCAGCC GGGTCTGTCT 60

GCTCCGCACT CTCGTCAGAT CCCGGCTCCG CAGGGTGCTG TTCTGGTTCA GCGTGAAAAA 120

GACCTGCCGA ACTACAAC TG GAACTCTTTC GGTCTGCGTT TC 162

<210> 3

<211> 146

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His
1 5 10 15
Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu
 20 25 30
Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp
 35 40 45
Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser
 50 55 60
Ile Lys Gly Val Ser Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly
65 70 75 80
Arg Leu Leu Ala Ser Lys Ser Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu
 85 90 95
Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr
 100 105 110
Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser
 115 120 125
Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala
 130 135 140
Lys Ser

145

<210> 4

<211> 165

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

GGTACTTCTC TGTCTCCGCC GCCGGAATCT TCTGGTTCTC GTCAGCAGCC GGGTCTGTCT 60
GCTCCGCACT CTCGTCAGAT CCCGGCTCCG CAGGGTGCTG TTCTGGTTCA GCGTGAAAAA 120
GACCTGCCGA ACTACAACTG GAACTCTTTC GGTCTGCGTT TCTGC 165

<210> 5

<211> 165

<212> DNA

<213> Human

<400> 5

GGTACTTCTC TGTCTCCGCC GCCGGAATCT TCTGGTTCTC GTCAGCAGCC GGGTCTGTCT 60
GCTCCGCACT CTCGTCAGAT CCCGGCTCCG CAGGGTGCTG TTCTGGTTCA GCGTGAAAAA 120
GACCTGCCGA ACTACAACTG GAACTCTTTC GGTCTGCGTT TCTGT 165

<210> 6

<211> 432

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

CCCAGGATG GCGGCAGCGG CGCCTTCCCG CCCGGCCACT TCAAGGACCC CAAGCGGCTG 60
TACTGCAAAA ACGGGGGCTT CTTCTGCGC ATCCACCCCG ACGGCCGAGT TGACGGGGTC 120
CGGGAGAAGA GCGACCCTCA CATCAAGCTA CAACTTCAAG CAGAAGAGAG AGGAGTTGTG 180
TCTATCAAAG GAGTGAGCGC TAATCGTTAC CTGGCTATGA AGGAAGATGG AAGATTACTA 240
GCTTCTAAGT CTGTTACGGA TGAGTGTTTC TTTTTGAAC GATTGGAATC TAATAACTAC 300
AATACTTACC GGTCAAGGAA ATACACCAGT TGGTATGTGG CACTGAAACG AACTGGGCAG 360
TATAAACTTG GATCCAAAAC AGGACCTGGG CAGAAAGCTA TACTTTTTCT TCCAATGTCT 420
GCTAAGAGCT GC 432

<210> 7

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 7

TATGGGTACT TCTCTGTCTC CGCCGCCGGA ATCTTC

36

<210> 8

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 8

TGGTTCTCGT CAGCAGCCGG GTCTGTCTGC TCCGCACTCT CGTCA

45

<210> 9

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 9

GATCCCGGCT CCGCAGGGTG CTGTTCTGGT TCAGCGTGAA AA

42

<210> 10

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 10

AGACCTGCCG AACTACAACT GGAAC TCTT CGGTCTGCGT TTCTGCC

47

<210> 11

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 11

ACGAGAACCA GAAGATTCCG GCGGCGGAGA CAGAGAAGTA CCCATA

46

<210> 12

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 12

AGCCGGGATC TGACGAGAGT GCGGAGCAGA CAGACCCGGC TGCTG

45

<210> 13

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 13

CGGCAGGTCT TTTTCACGCT GAACCAGAAC AGCACCTGC GG

42

<210> 14

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/08837

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12P21/02, C07K14/47, C12N1/21//
C07K19/00, C07K1/107, (C12N1/21, C12R1:19),

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12P21/02, C07K14/47, C12N1/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP, 887417, A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD), 30 December, 1998 (30.12.98) & CA, 2242086, A & JP, 11-71396, A	1-16
Y	EP, 499990, A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD), 26 August, 1992 (26.08.92) & CA, 2061382, A & JP, 5-304976, A & AT, 138102, T & ES, 2087323, T & US, 5861284, A	1-16
Y	West, A. et al., "Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene(KISS1)", GENOMICS (1998) Vol.54 No.1 P.145-148	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not
 considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing
 date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
 cited to establish the publication date of another citation or other
 special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
 means
 "P" document published prior to the international filing date but later
 than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
 priority date and not in conflict with the application but cited to
 understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered novel or cannot be considered to involve an inventive
 step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered to involve an inventive step when the document is
 combined with one or more other such documents, such
 combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 March, 2001 (09.03.01)

Date of mailing of the international search report
21 March, 2001 (21.03.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ C12N15/12, C12P21/02, C07K14/47, C12N1/21// C07K19/00, C07K1/107, (C12N1/21, C12R1:19)		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ C12N15/12, C12P21/02, C07K14/47, C12N1/21		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	EP, 887417, A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 30. 12月. 1998 (30. 12. 98) & CA, 2242086, A & JP, 11-71396, A	1-16
Y	EP, 499990, A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 26. 8月. 1992 (26. 08. 92) & CA, 2061382, A & JP, 5-304976, A & AT, 138102, T & ES, 2087323, T & US, 5861284, A	1-16
Y	West, A. et al. "Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1)" GENOMICS (1998) Vol. 54 No. 1 P. 145-148	1-16
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 09. 03. 01	国際調査報告の発送日 21.03.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 六笠 紀子 印	4B 9735
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.